



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGENÉTICO
DE SEMENTES MADURAS DE FORRAGEIRAS
APOMÍTICAS *Brachiariaruziziensis* E
Panicummaximum PARA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

LETÍCIA CALAZANS QUEIROZ

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Brasília, DF
2013**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGENÉTICO
DE SEMENTES MADURAS DE FORRAGEIRAS
APOMÍTICAS *Brachiariaruziziensis* E
Panicummaximum PARA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**ORIENTADORES: Prof.º JOSÉ RICARDO PEIXOTO, Dra. VERA TAVARES
DE CAMPO CARNEIRO e Dra. GLAUCIA BARBOSA CABRAL**

**Brasília, DF
2013**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOGENÉTICO
DE SEMENTES MADURAS DE FORRAGEIRAS
APOMÍTICAS *Brachiaria ruziziensis* E
Panicum maximum PARA TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

LETÍCIA CALAZANS QUEIROZ

Trabalho de monografia apresentado à
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília
– UnB, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

APROVADO POR:

Dr. José Ricardo Peixoto
Doutor, Universidade de Brasília – UnB
e-mail: peixoto@unb.br

Dr. Márcio de Carvalho Pires
Doutora, Universidade de Brasília – UnB
e-mail: mcpires@unb.br

Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro
Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
e-mail: vera.carneiro@embrapa.br

Brasília, 20 de dezembro de 2013.

Dedico aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, e aos meus irmãos e namorado, por encherem essa minha trajetória de alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui, pois sei que sem minha fé n'Ele nada disso seria possível.

Aos meus avós por todo o incentivo e os sábios conselhos, que mesmo longe vivenciam minhas conquistas; e a meus pais José Sebastião Neto e Sílvia Quintão Queiroz, que são a verdadeira razão da chegada até aqui. Muito obrigada por acreditarem tanto em mim, por se envolverem e fazerem de tudo por minha felicidade. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Peo e Silvinha, por serem os anjos da minha vida, e a meu querido amigo e namorado Daniel Carvalho Junqueira Cardone, por toda a paciência, carinho e ajuda em todas as situações.

Aos meus amigos do curso de agronomia, em especial à Hanna Alves, Carlos Luz, Heyder Monteiro Lopes e Erich Brandani, por terem enchido esses anos de felicidades; e a Felipe Sagratzki, amigo e irmão de todas as horas.

Às Doutoradas e orientadoras Vera Tavares de Campos Carneiro e Glaucia Barbosa Cabral, pela oportunidade do estágio, por toda ajuda e pelo imenso aprendizado que recebi em tão pouco tempo; e à banca avaliadora deste trabalho, composta pelo professor e amigo José Ricardo Peixoto, Dr. Márcio de Carvalho Pires e Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro, por aceitarem o convite com tanta gentileza.

Ao CNPq pela oportunidade da bolsa PIBIC e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que ofereceu todo o suporte para a realização deste trabalho. Agradeço também a todos os professores e coordenadores do curso de Agronomia da Universidade de Brasília, que se empenham com afinco para a formação de bons profissionais.

A todos os meus queridos amigos, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Obrigada a todos!

RESUMO

Brachiaria ruziziensis (*B. ruzi*) e *Panicum maximum* são forrageiras de grande interesse agrônomo e que possuem plantas de reprodução apomítica e sexual. O desenvolvimento de metodologias de regeneração para ambas abrirá perspectivas para futuros trabalhos de transformação genética para introdução de características agronômicas desejáveis. O objetivo deste trabalho foi testar a capacidade de indução de calos embriogênicos em sementes das duas espécies que foram cultivadas em diferentes meios de cultura. Posteriormente, os calos obtidos foram submetidos à transformação genética via biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*. Sementes maduras de *B. ruzi* das cultivares Tanzânia e Mombaça de *Panicum maximum* foram induzidas nos diferentes meios de cultura, M1.3, M1.4 ou LP9. Os calos obtidos foram avaliados e posteriormente transferidos para os respectivos meios de indução em repicagens sucessivas para multiplicar os calos embriogênicos, que em seguida foram cultivados em meio de regeneração MSCLreg. Nas condições de cultura testadas, 13% das sementes de *B. ruzi* formaram calos embriogênicos no meio M1.3, enquanto que 48% formaram calos friáveis no meio LP9. A cultivar Mombaça de *P. maximum* apresentou maior resposta de indução de calos friáveis e embriogênicos em relação a cultivar Tanzânia, sendo o meio M1.3 o que resultou em maior indução de calos embriogênicos em 9% dos explantes. Os calos submetidos à transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística estão em meio de regeneração na presença do agente seletivo higromicina.

Palavras-chave: *Agrobacterium tumefaciens*, cultivares Mombaça e Tanzânia, biobalística, variabilidade genética, embriogênese somática, cultura *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Sementes maduras descascadas das cultivares Mombaça e Tanzânia de <i>Panicum maximum</i> e <i>B. ruzi</i> , antes da seleção e desinfestação.	20
2	Representação esquemática do vetor PGPro 1pUbi1 utilizado na transformação genética de calos embriogênicos oriundos de sementes maduras de <i>Brachiaria ruziziensis</i> via <i>Agrobacterium</i> e biobalística (CABRAL, 2012).	22
3	Placa utilizada no processo de transformação genética via biobalística, com o círculo de morte de 1,5 cm de diâmetro em seu centro.	25
4	Aspectos da cultura de tecidos a partir de sementes de <i>Panicum maximum</i> e <i>Brachiaria ruziziensis</i> .	27
5	Embriões somáticos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> em desenvolvimento em meio MSCL reg com higromicina após a transformação genética via biobalística.	30
6	Embriões somáticos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> em desenvolvimento em meio MSCL reg com higromicina após a transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Gênero <i>Brachiaria</i>	10
2.2. Gênero <i>Panicum</i>	12
2.3. Apomixia.	13
2.4. Embriogênese somática.....	Erro! Indicador não definido.
2.5. Transformação genética	16
2.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.7. Biobalística.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material vegetal	19
3.2. Desinfestação de sementes.....	20
3.3. Indução da calos embriogênicos	21
3.4. Plasmídeo	22
3.5. Transformação genética	22
3.5.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Erro! Indicador não definido.
3.5.2. Biobalística	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
4.1. Indução de calos embriogênicos em <i>Brachiaria ruziziensis</i>	Erro!
Indicador não definido.	
4.2. Indução de calos embriogênicos em <i>Panicum maximum</i> , cultivares Mombaça e Tanzânia	Erro! Indicador não definido.
4.3. Transformação de calos embriogênicos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4. Transformação de calos embriogênicos de <i>Brachiaria ruziziensis</i> via Biobalística.....	30
5. CONCLUSÕES GERAIS	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de espécies dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* através de cruzamento intra e interespecíficos têm encontrado vários obstáculos, pois a maioria desses acessos são poliploides, e a poliploidia parece estar relacionada com a apomixia (MENDES-BONATO *et al.*, 2003). A impossibilidade de cruzamento devido à diferença de ploidia entre acessos apomíticos e sexuais dentro de uma mesma espécie traz como consequência uma base genética estreita (VALLE *et al.*, 2006).

A maioria das plantas superiores se reproduz sexualmente através da união de um núcleo espermático (gameta masculino) com a oosfera (gameta feminino), o que propicia a recombinação gênica e o consequente ganho de variabilidade genética. Entretanto, em muitas espécies de plantas, a meiose e a fertilização não estão envolvidas na formação da semente, a qual é originada por um processo chamado apomixia, no qual a progênie corresponde a um clone da planta mãe (CRUZ *et al.*, 1998).

A apomixia e a reprodução sexual podem ocorrer simultaneamente numa mesma planta ou no mesmo óvulo. Em plantas apomíticas obrigatórias não há a ocorrência de reprodução sexual, enquanto que em plantas apomíticas facultativas pode haver a formação tanto de sementes de origem zigótica como de origem apomítica. Dessa forma, a progênie destas plantas é constituída por uma população variável, com plantas que podem ser clones da planta mãe e outras híbridos sexuais (KOLTUNOW *et al.*, 1995).

Devido à adaptação de algumas espécies do gênero *Brachiaria* aos solos ácidos e pobres das savanas brasileiras, esta gramínea alcançou considerável importância nos sistemas de produção de gado, sendo *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) cv. Marandu e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, ambas poliploides e apomíticas naturais, as principais espécies cultivadas no país (VALLE *et al.*, 2006).

Espécies do gênero *Panicum* também vêm sendo amplamente utilizadas no país, preferencialmente em solos de média a alta fertilidade para a produção de forragem (ALCÂNTARA *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de métodos de transformação genética via *Agrobacteriumtumefaciens* e Biobalística, além de aumentar a variabilidade genética existente, torna possível criar variabilidade não disponível, bem como a inserção de características agrônômicas desejáveis, como resistência à seca, cigarrinha das pastagens e aumento de biomassa.

Este trabalho teve como objetivo testar a capacidade de indução de calos embriogênicos em sementes maduras de *Brachiariaruziziensis* e *Panicummaximum*, as quais foram cultivadas em diferentes meios de cultura. Posteriormente, os calos obtidos foram submetidos à transformação genética via biobalística ou *Agrobacteriumtumefaciens*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Brachiaria*

Brachiaria é um gênero composto por aproximadamente 100 espécies que tem origem nas savanas africanas e que se adaptou bem numa ampla gama de habitats das regiões tropicais e subtropicais (RENVOIZE *et al.*, 1996). Esse gênero alcançou considerável importância nos sistemas de produção de gado devido à adaptação de algumas espécies aos solos pobres e ácidos das savanas brasileiras. As duas principais espécies cultivadas no país, *Brachiariabrizantha* (Syn. *Urochloabrizantha*) cv. Marandue e *Brachiariadecumbens* cv. Basilisk são poliplóides e apomíticas naturais, fatores limitantes à sua hibridização direta. A diferença de ploidia entre acessos apomíticos e sexuais dentro de uma mesma espécie acarreta em uma base genética estreita como consequência primeiramente da impossibilidade de cruzamento e também da reprodução clonal, representando um risco tanto à produção de gado quanto ao ecossistema (VALLE *et al.*, 2006).

Esse gênero encontra-se no grupo *Panicea* da família *Poaceae*, e tem como principais características a presença de espiguetas ovais ou oblongas em racemos unilaterais. Dentro do pequeno grupo de gênero a que pertence estão *Urochloa*, *Eriochloa* e *Panicum*, tendo todos em comum a presença da enzima PEP – carboxilase e rota fotossintética do tipo C4 (RENVOIZE *et al.*, 1996).

Brachiaria ruziziensis (*B. ruzi*) é uma gramínea de alta qualidade nutritiva que fornece uma forragem muito palatável, mas que é exigente quanto a solos bem drenados e maior fertilidade, apresentando alta suscetibilidade à cigarrinhas pastagens (Homoptera: Cercopidae: *Zulia entreriana*, *Deois flavopicta*, *Aeneolamia varia* e *Mahanarva fimbriolata*). Além disso, apresenta menor produtividade do que *B. decumbens* (KELLER-GREIN *et al.*, 1996). Devido ao seu hábito de crescimento ereto e cespitoso, *B. ruzi* promove a total cobertura do solo, facilitando o desempenho das sementeiras quanto à velocidade e uniformidade do plantio (MATEUS *et al.*, 2010).

B. brizantha cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk foram selecionadas dentro da variabilidade genética natural de diversos acessos, e várias características agronômicas e zootécnicas desejáveis como resistência à cigarrinha, a solos ácidos, palatabilidade e digestibilidade ainda precisam ser introduzidas. Os programas de melhoramento genético através de cruzamentos intra e interespecíficos têm sido desenvolvidos, com vários obstáculos para essas espécies, pois a maioria dos acessos de *Brachiaria* são poliplóides, e a poliploidia parece estar relacionada com a apomixia. Neste gênero os acessos poliplóides são geralmente apomíticos, embora pseudogâmicos, o que torna essencial o pólen fértil para fertilizar o núcleo da célula central do saco embrionário para tornar possível a produção de sementes viáveis (MENDES-BONATO *et al.*, 2003).

2.2. Gênero *Panicum*

O gênero *Panicum* também pertence à família *Poaceae*, tribo *Paniceae* assim como o gênero *Brachiaria*. Sua distribuição geográfica compreende a zona equatorial úmida, em regiões da África, Américas Central e do Sul, norte da Austrália, Índia, sudeste da Ásia e as Ilhas do Pacífico, numa altitude de até 2.000 metros (ROCHA, 1991, apud POMPEU, 1996). Esse gênero também é originário da África tropical e formas nativas são encontradas até a África do Sul, em margens florestais, como capim pioneiro ocupando áreas recém-desmatadas e em pastagens sob a sombra de árvores (JANK, 1995).

As espécies do gênero *Panicum* apresentam hábito de crescimento ereto e cespitoso, elevada variabilidade morfofisiológica e genética em relação a características como resistência ao enxarcamento e ao alumínio, assim como em exigências em termos de fertilidade do solo (CORSI, 1995). Esse gênero vem sendo utilizado no Brasil preferencialmente em solos de média a alta fertilidade para a produção de forragem (ALCÂNTARA *et al.*, 1993).

Panicum maximum é uma cultura perene, na qual é observada a formação de touceiras com profundo sistema radicular, e altura que varia entre 60-200 cm, limbo foliar de cor verde escura que termina em pontas finas, e panículas com 12 a 40 cm (SKERMAN e RIVEROS, 1992). Na década de 1990 foram lançadas as cultivares de *Panicum maximum* Tanzânia, em 1990, e Mombaça, em 1993, pela EMBRAPA gado de Corte, que demonstraram melhor produtividade do que as cultivares utilizadas tradicionalmente, Colônia e Tobiatã (CORSI e SANTOS, 1995). Embora mais produtivas, as novas cultivares apresentaram maior exigência quanto à fertilidade do solo e disponibilidade hídrica (POMPEU, 2006).

O capim Mombaça é uma cultivar que apresenta grande produtividade, menor estacionalidade de produção do que o capim Colônia e tem uma elevada produção de folhas, principalmente na seca (MULLER *et al.*, 2002). O plantio de Tanzânia tem sido estimulado devido às suas boas características agrônômicas e zootécnicas (GERDES *et al.*, 2000). O capim

Tanzânia apresenta porte ereto e cespitoso, com altura de aproximadamente 1,20m, apresenta folhas estreitas e decumbentes, sem pilosidade e cerosidade, e seus colmos são levemente arroxeados (JANK, 1995).

2.3. *Apomixia*

A reprodução clonal através de semente não é um raro evento em plantas, pois várias angiospermas desenvolvem dessa forma por um processo chamado apomixia (KOLTUNOW, 1993). Apomixia equivale a agamospermia, formação assexual de semente (GUSTAFSSON, 1946) e ocorre em todo reino vegetal, desde algas a angiospermas (ASKER e JERLING, 1992). As famílias com mais representantes apomíticos são *Poaceae*, *Compositae* e *Rosaceae* (RICHARDS, 1986) e esse processo tem um importante papel no melhoramento de plantas, pois proporciona uma oportunidade de clonagem através da semente (HANNA e BASHAW, 1987).

Na reprodução sexual, meioses antecede a formação de gametas e em seguida a fertilização restaura o número de cromossomos somáticos. A reprodução sexual envolve uma dupla fecundação, onde um dos núcleos espermáticos se une com o núcleo da célula ovo para formar o zigoto, que dará origem ao embrião. O outro núcleo espermático se funde com dois núcleos polares da célula central do saco embrionário, resultando em um triploide que dará origem ao endosperma (ASKER, 1979).

Os processos apomíticos ocorrem no óvulo, resultando em progênie geneticamente idêntica à planta mãe, pois a fertilização da célula ovo não é necessária para o desenvolvimento autônomo do embrião apomítico (KOLTUNOW, 1993). De acordo com ASKER (1979), a agamospermia pode ser dividida em embrião adventícia e apomixia gametofítica. A primeira ocorre quando um embrião é formado diretamente de uma célula somática no óvulo, sem que haja formação do saco embrionário e célula ovo, o que acontece comumente em espécies de *citrus* e orquídeas. A apomixia gametofítica, por sua vez, pode ser dividida em diplosporia e aposporia. Nos dois processos há substituição da meiose pela mitose, acarretando em saco embrionário e célula

ovo com o número de cromossomos igual ao da planta mãe. Na diplosporia o saco embrionário se origina por divisão mitótica da célula mãe do megásporo, enquanto que na aposporia o saco embrionário se origina de divisão mitótica de uma célula somática do nucelo (HANNA e BASHAW, 1987).

Coletas de *Panicum maximum*, *B. brizantha* e *B. decumbens* na África encontraram acessos sexuais diplóides que após passarem por duplicação cromossômica com colchicina, puderam ser utilizadas em cruzamentos com plantas apomícticas tetraplóides (VALLE *et al.*, 1989). Também foram obtidos tetraplóides de *B. ruziziensis* por ISHIGAKI *et al.* (2009) após o tratamento de diplóides com colchicina.

De acordo com JANK e VALLE (2005) a apomixia é determinada por apenas um gene ou um grupo de genes localizados muito próximos no cromossomo, que apresentam herança simples para essa forma de reprodução com caráter dominante (aplocus). Com isso, as progêies de cruzamentos de plantas sexuais e apomícticas compreendem metade de plantas sexuais e a outra metade de plantas apomícticas. Essas, por sua vez, têm vigor híbrido fixado já na primeira geração por não hibridarem entre si, sendo candidatas imediatas a lançamento. Entretanto, melhorar gramíneas forrageiras é mais complexo do que o melhoramento de outras culturas, já que o que se mede na planta não é o que será consumido pelo ser humano, mas o alimento indireto que será convertido em carne e leite. Assim, a superioridade de uma nova cultivar deve ser medida pela sua capacidade de conversão em carne ou leite, que somente pode ser avaliada em grandes áreas e sob pastejo animal (JANK e VALLE *et al.*, 2005).

2.4. Embriogênese somática

Embriogênese somática é o processo em que células haplóides ou somáticas se desenvolvem em resposta a diferentes estímulos indutores em diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (BATISTA, 2012). Embriões somáticos podem ser induzidos em diferentes tipos de explantes através da manipulação

das condições de cultura *in vitro*, e passam por estádios similares aos observados na embriogênese zigótica (ZIMMERMAN, 1993).

Embriões somáticos têm sido obtidos em diferentes espécies de plantas. Dentre os explantes que vem sendo utilizados para indução de embriogênese somática podem ser citados micrósporos, anteras, ovários, protoplastos, embriões zigóticos imaturos ou maduros, inflorescências imaturas, sementes maduras, folhas, explantes oriundos da cultura *in vitro* etc (DUDITS *et al.*, 1995). A cultura de tecidos pode ser utilizada para a produção de plantas *in vitro* ou micropropagadas, recuperação de plantas isentas de vírus, conservação de germoplasma, obtenção de mutantes *in vitro*, obtenção de organismos haplóides e hapodiplóides, resgate de embriões, bem como a produção de plantas transgênicas (TORRES *et al.*, 1998).

MERKLE (1995) ressalta que a embriogênese somática é a melhor forma de reprodução *in vitro* de fruteiras devido à vantagem da elevada taxa de multiplicação em relação a outros processos de propagação; ao escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido, eliminando a dependência de períodos específicos de disponibilidade de material propagativo; plantio direto da muda obtida por meio da embriogênese somática sem necessidade de enxertia, e o fato da planta ser um clone da planta-mãe; além de tornar possível a transferência de genes.

De acordo com GUERRA *et al.* (1999) a embriogênese somática pode ser natural ou induzida. Quando ocorre de forma natural, células do tecido embrionário podem ser direcionadas para essa rota de desenvolvimento, como observado em *citrus*, onde os embriões adventícios originam-se por gemação e são geneticamente idênticos à planta-mãe. Na embriogênese somática induzida ou *in vitro*, estímulos ambientais ou químicos podem induzir células que se encontram em diferentes estádios de diferenciação, fazendo com que estas possam adquirir novas competências morfogênicas. A forma mais utilizada para se induzir competência embriogênica em células é a exposição dos explantes a altos níveis de auxinas durante períodos de tempo variáveis, seguido pela sua retirada e transferência para meio livre deste regulador de crescimento (VICIENTE e MARTINEZ,

1998). Geralmente, uma alta concentração de auxinas favorece o desenvolvimento de raízes, enquanto que uma alta concentração de citocininas estimula o desenvolvimento de tecidos da parte aérea (KANG e CHUN, 1997).

Formas diretas ou indiretas podem ocorrer no processo de embriogênese somática. No primeiro caso há formação de embriões somáticos diretamente sobre a superfície do explante, enquanto que na embriogênese somática indireta calos são induzidos e a partir desses se desenvolvem os embriões somáticos (GEORGE, 1993). A embriogênese somática indireta é mais comumente observada na maioria das espécies (BAJAJ, 1995).

2.5. Transformação genética

Os métodos de transferência de genes mais utilizados atualmente para a transformação genética de plantas são *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística. A transformação genética é uma ferramenta que permite a inserção de genes de interesse no DNA das plantas, o que aumenta a variabilidade genética natural existente, além de criar variabilidade não disponível via métodos de melhoramento convencional (HANDEL *et al.*, 1997). O melhoramento de espécies tropicais é em grande parte baseado na seleção de indivíduos a partir da variabilidade genética natural em coleções restritas e ainda pouco estudadas, tornando menos ampla a sua base genética (PEREIRA *et al.*, 2001). O aumento da variabilidade genética em plantas naturalmente apomíticas com a introdução de novas características agronomicamente desejáveis permitirá ao produtor reproduzir as suas próprias sementes, mantendo estáveis genótipos de alto valor agregado e diminuindo os custos de produção (Valle *et al.*, 2004).

No processo de transformação genética é feito o uso de genes marcadores ou repórteres, que permitam a diferenciação de células transgênicas por meio da observação visual, como os genes *gus* (β -glucuronidase) *egfp*, (*green fluorescent protein*). A atividade da β -glucuronidase pode ser detectada através de ensaios histoquímicos, fluorimétricos e espectrofotométricos (LACORTE, 1998). O ensaio histoquímico, método

qualitativo, se baseia na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-Glucuronídeo(X-Glu) pela enzima β - glucuronidase, onde o produto dessa reação, quando na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em uma precipitação insolúvel de cor azul (JEFFERSON,1987). Em explantes inoculados com *Agrobacterium* pode-se verificar a eficiência da transformação por meio da porcentagem da área de tecidos que expressam GUS ou pelo número de pontos azuis (NOVOA e COLES, 1994 ; RUSSELL *et al.*, 1992).

A GFP foi originalmente obtida de uma espécie de água viva (*Aequorea victoria*) (STEWART, 2005) e é bastante utilizada e conveniente porque é avaliada por meio de fluorescência, não sendo um método destrutivo, como no caso da GUS (ZHAO *et al.*, 2013).

Nos experimentos de transformação deve se adicionar ao meio de cultura um agente seletivo que proporcione uma vantagem seletiva às células que possuem o gene marcador de seleção em relação às que não os possui. O protocolo deve assegurar a proliferação celular e o desenvolvimento de estruturas organizadas, bem como permitir a recuperação de plantas transgênicas (WILMINK e DONES, 1993). Neste trabalho, o agente seletivo higromicina foi utilizado porque o vetor introduzido nas células apresentava o gene marcador de seleção *hptII*, higromicina fosfotransferase.

2.6. *Agrobacterium tumefaciens*

O gênero *Agrobacterium* pertence à família *Rhizobiaceae*, é uma bactéria de solo, Gram-negativa e que vive em associação com a rizosfera das plantas (REAM, 1989). Este microorganismo induz a formação de tumores, conhecidos como “galhas”, devido à expressão de genes localizados em seu T-DNA, que é transferido para a célula vegetal. Nas cepas patogênicas, a virulência é causada por um plasmídeo de alto peso molecular (150-250 kb), chamado de Ti ("Tumor inducing"). A forma de se retirar a patogenicidade da bactéria é excluindo os genes de síntese de fitohormônios do seu T-DNA, o que não afeta seu processo de transferência genética (BRASILEIRO, 1995).

Agrobacterium spp. têm uma faixa de hospedeiros muito ampla, incluindo mais de 643 espécies vegetais, onde existe uma grande diferença de suscetibilidade à bactéria mesmo em variedades pertencentes a uma mesma espécie (BINNS, 1990).

Embora *Agrobacterium tumefaciens* tenha sido utilizada com sucesso para transferência gênica em uma vasta gama de espécies de plantas, tem se dado pouca atenção para a transformação de gramíneas forrageiras (SOMLEVA *et al.*, 2002). De acordo com resultados obtidos por SOMLEVA *et al.* (2002), transformações genéticas em *Panicum virgatum* com a cepa AGL1 de *Agrobacterium* contendo o vetor binário pDM805 alcançaram sucesso, resultando na produção de aproximadamente 600 plantas transgênicas.

Usando as linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e LBA4404, ambas contendo o pGPro1pUbi1, CABRAL (2012) obteve um sistema de agroinfiltração rápido, eficiente, simples e de baixo custo para a expressão de genes repórteres nas cultivares Primavera de *Oryza sativa* e Marandu de *Brachiaria brizantha*, sendo a *Brachiaria brizantha* mais suscetível às linhagens utilizadas do que o arroz.

2.7. Biobalística

O processo de biobalística ou aceleração de partículas se baseia na inserção de micropartículas de ouro ou tungstênio, revestidas com DNA de interesse, no núcleo de plantas, seguido pela integração do vetor de interesse ao genoma vegetal. A aceleração das micropartículas pode ocorrer com gás comprimido (hélio), com velocidade suficiente (1.500 km/h) para penetrarem as células de um tecido alvo, processo esse que ocorre no interior de uma câmara sob vácuo, para evitar que o ar provoque a desaceleração das micropartículas. O acelerador de micropartículas, também conhecido como “gene gun”, é o aparelho responsável por gerar a onda de choque (KLEIN *et al.*, 1987; SANFORD *et al.*, 1993).

De acordo com GRAY & FINER (1993) a transformação genética via bombardeamento de partículas oferece algumas vantagens em relação ao

uso de *Agrobacterium*, como protocolos de transformação menos exigentes e uso de construções mais simples de vetores, já que não há as complexas interações entre planta e bactéria. Outra vantagem na utilização do método é a de que vários tecidos podem ser bombardeados, como inflorescências, micrósporos ou embriões imaturos, sem a necessidade de se utilizar uma *Agrobacterium* específica para a linhagem que se está trabalhando (BECKER *et al.*, 1994). Uma das desvantagens em se utilizar este método é que várias cópias do material genético são transferidos para a planta, problema que pode ser manipulado ao se utilizar técnicas de engenharia genética (CASA Set *et al.*, 1993).

Esse processo tem-se mostrado efetivo desde a transformação de microrganismos até plantas e animais, utilizando-se de técnica relativamente simples, rápida e que não envolve muitos investimentos (SANFORD *et al.*, 1993). Plantas transgênicas de *B. ruziziensis* foram obtidas por ISHIGAKI *et al.* (2012) via biobalística, com a utilização de um vetor contendo gene para resistência a herbicida (*bar*) e o gene repórter β -glucuronidase (GUS). Calos de *B. brizantha* bombardeados com o vetor pAHUG originaram plântulas resistentes à higromicina, sendo constatado a presença do gene *hptII* por meio de PCR, sem a presença do gene *gus* (CABRAL, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes maduras de gramíneas apomíticas naturais, *Brachiaria ruziziensis* e as cultivares Mombaça e Tanzânia de *Panicum maximum*. As sementes foram obtidas da Embrapa Gado de Corte, MS.

3.2. Desinfestação das sementes

Após a retirada manual dalema e da pálea, as sementes de *Brachiaria ruziziensis* das cultivares de *Panicum maximum* foram desinfestadas em etanol 70% durante 5 minutos e levadas para solução de hipoclorito de sódio 2% por 40 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas por cinco vezes com água autoclavada, sendo colocadas sobre papel filtro autoclavado para retirada do excesso de água e estavam prontas para serem introduzidas nos meios de cultura.

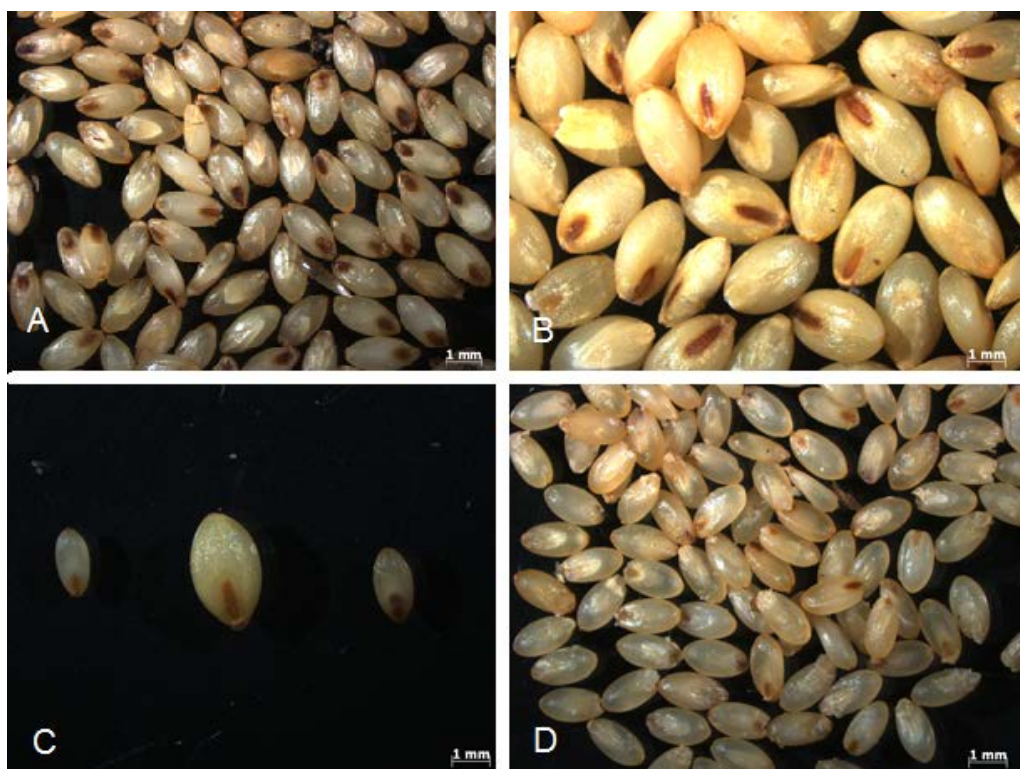


Foto: Letícia Calazans Queiroz

Figura 1- Sementes maduras descascadas das cultivares Mombaça e Tanzânia de *Panicum maximum* B.ruzi, antes da seleção e desinfestação. (A) Sementes da cultivar Mombaça de *Panicum maximum*, com a presença de sujidades, sementes quebradas e contaminadas; (B) Sementes de *B. ruzi*, com unidades quebradas, trincadas e contaminadas; (C) Comparação entre os tamanhos das sementes de Tanzânia (esq.), *B. ruzi* (centro) e Mombaça (dir.). (D) Sementes da cultivar Tanzânia de *Panicum maximum* com algumas unidades apresentando rachaduras e quebras

3.3. Indução de calos embriogênicos

As sementes foram introduzidas em placas de Petri contendo três diferentes meios de cultura (Tabela 1): M1.3, M1.4 e LP9. Em cada placa foram colocadas 12 sementes, com o hilo destas voltado para baixo e em maior contato com o meio. Após a introdução, as placas foram cultivadas em câmara de crescimento no escuro a 25 ± 2 °C. Após um mês de cultivo os explantes foram avaliados e em seguida foram repicados para seus respectivos meios de indução em sucessivas repicagens, para estimular o desenvolvimento de calos embriogênicos para transformação genética.

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática e regeneração em sementes maduras de *Brachiaria ruziziensis* e *Panicum maximum*

Componentes	Meios de cultura			
	M1.3	M1.4	LP9	MSCLreg
Sais de MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS
Sacarose	3%	3%	3%	3%
Caseína hidrol.	300mg/L	---	500mg/L	300mg/L
Cinetina	---	---	---	2,5mg/L
ANA	---	---	---	0,5mg/L
2,4-D	3mg/L	4mg/L	5mg/L	---
BAP	0,2mg/L	0,2mg/L	0,2mg/L	1mg/L
Ágar	1,4%	---	---	0,7%
Phytigel	---	0,3%	0,3%	---
pH	4	5,8	5,8	5,8

3.4. Plasmídeo

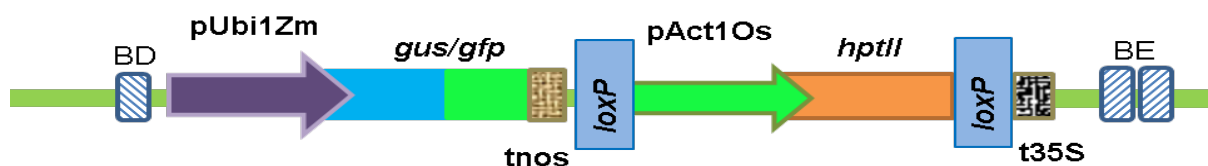


Figura 2- Representação esquemática do vetor PGPro1pUbi1 utilizado na transformação genética de calos embriogênicos oriundos de sementes maduras de *Brachiaria ruziziensis* via *Agrobacterium* e biobalística (CABRAL, 2012)

O plasmídeo utilizado na transformação genética tanto via *Agrobacterium* quanto via biobalística foi o vetor binário PGPro1pUbi1. O promotor pUbi1 de milho (pUbi1Zm) dirige a expressão dos genes repórteres fusionados *gus/gfp*, que codificam para as proteínas GUS, β - glucuronidase e GFP, *green fluorescent protein*. O promotor de act1 de arroz (pAct1Os), dirige a expressão do gene de resistência a higromicina (*hptII*), higromicinafosfotransferase (CABRAL, 2012).

Linhagens desarmadas de Agrobacterium tumefaciens

A linhagens EHA105 e LBA4404 contendo o plasmídeo pGPro1pUbi1 foram usadas para cocultura com calos embriogênicos de *B. ruziziensis* (CABRAL, 2012).

3.5. Transformação genética

Calos embriogênicos de *Brachiaria ruziziensis* foram submetidos à transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística.

3.5.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Preparo das Agrobactérias

Alíquotas de 200µL, anteriormente preparadas das linhagens de agrobactérias, foram espalhadas em placa de Petri contendo meio de cultura AB (Tabela 2) com os antibióticos rifampicina e canamicina, para a linhagem de EHA105, e rifampicina, canamicina e spectinomicina, para a cepa de LBA4404. As agrobactérias foram cultivadas por três dias a 28 °C.

Tabela 2 - Meio de cultura AB sólido para crescimento de agrobactérias

Meio AB			
Tampão AB estoque 20X		Sais AB 20X	
Na ₂ HPO ₄	60g/L	NH ₄ Cl	20g/L
NaH ₂ PO ₄	20g/L	MgSO ₄ .7H ₂ O	6g/L
		KCl	3g/L
		CaCl ₂	0,20g/L
		FeSO ₄ .7H ₂ O	50mg/L

No dia da cocultura, o crescimento bacteriano foi coletado das placas com a ajuda de uma espátula, o qual foi ressuscitado em 12 mL de meio R2CL 400 AS. Foi feita a leitura da D.O₆₀₀, a qual foi ajustada para 0,5 com adição de meio líquido.

Tabela 3- Meios utilizados para a cocultura líquida e sólida com *Agrobacterium tumefaciens*

Componentes	Co-cultura sólida (R2CS)	Co-cultura líquida (R2CL)
Macronutrientes	R2	R2
Micronutrientes	R2	R2
Vitaminas	R2	R2
2,4-D	2,5mg/L	2,5mg/L
Glicose	1%	1%
Acetoseringona	400µM	400µM
Agarose tipo I	7g/L	---
pH	5,2	5,2

Cocultura

Com o auxílio de um bisturi, calos embriogênicos obtidos em meio M1.3 e M1.4, foram separados dos calos friáveis e raízes sobre papel filtro autoclavado. Após a seleção, os explantes foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL contendo somente meio líquido R2CL (controles) ou as linhagens EHA105 ou LBA4404 anteriormente ressuspendidas. O material foi mantido em agitador do tipo Vórtex por 10 seg, seguido por 5 min no sonicador e em seguida, foram submetidos a vácuo por 20 minutos (pressão de 27cm/Hg). Os explantes foram colocados sobre papel filtro autoclavado e foram introduzidos no meio de cocultura sólida R2Cs 400 AS (Tabela 3). Foram inoculados 50 explantes por placa que foram mantidos no escuro a 20 °C por três dias. Após a cocultura sólida, os calos foram cultivados em meio M1.3 com os antibióticos higromicina 20mg/L, timetin 100mg/L e cefotaxima 400mg/L. A cada 14 dias os calos foram repicados para o meio M1.3 na presença dos mesmos antibióticos e foram cultivados no escuro a 25 ± 2 °C.

Após três repicagens, os calos foram transferidos para o meio MSCLreg (Tabela 1) na presença de antibióticos, cultivados sob fotoperíodo de 16 h a 25 ± 2 °C.

3.5.2. Biobalística

Calos embriogênicos obtidos de sementes maduras de *Brachiaria ruziziensis* nos meios de indução M1.3 e M1.4 (Tabela 1) foram posicionados em uma placa contendo meio M1.3. Os calos embriogênicos foram dispostos ao redor de um círculo com diâmetro de 1,5 cm, feito no centro da placa, para se evitar demasiada exposição às micropartículas utilizadas no bombardeamento.



Foto: Letícia Calazans Queiroz

Figura 3 - Placa utilizada no processo de transformação genética via biobalística, com o círculo de 1,5 cm de diâmetro onde ocorre morte dos explantes devido ao excesso de micropartículas liberadas no ato do tiro. Os explantes são posicionados no meio de cultura na parte externa do círculo, contornando o mesmo

Esterilização e lavagem de micropartículas

Em um mL de etanol 70% foram acrescentados 60 mg de partículas de tungstênio M5, os quais foram misturados e mantidos em agitador tipo Vórtex por 15 minutos, em baixa velocidade. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10.000 RPM por 5 min, com posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se então um mL de água destilada estéril, seguida por mistura vigorosa em agitador e centrifugação, como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida por mais duas vezes. Após a lavagem final, o sobrenadante foi descartado e as partículas ressuspensas em um mL de glicerol 50% autoclavado.

Preparo de partículas para bombardeamento

As micropartículas foram sonicadas por 5 min e mantidas por 10 min no agitador (Vórtex), sendo então distribuídas em alíquotas de 50 μ L em tubos de centrífuga do tipo Eppendorf, aos quais foram adicionados nessa sequência 8 μ L de DNA (pGPro1pUbi1 a 1 μ g/ μ L), 50 μ L de CaCl_2 e 20 μ L de espermidina 0,1M. O material foi então colocado no agitador tipo vortex por 10

min e agitado por 10 segundos, com a posterior retirada do sobrenadante. Em seguida as partículas foram ressuspensas em 150 μ L de etanol absoluto e foram agitadas por 10 seg. O sobrenadante foi retirado, com nova adição de etanol absoluto e posterior agitação. Por fim, o precipitado foi ressuspendido com 24 μ L de etanol absoluto, e após a sonicação por 2 segundos, foram aplicados 3,2 μ L da mistura em cada membrana carreadora. A membrana com o precipitado foi deixada no dessecador por 15 minutos.

Todo o material utilizado nesse processo estava estéril, com membranas carreadoras autoclavadas e lavadas em etanol. A umidade do local onde foi feito o bombardeamento também era controlada, com umidade relativa do ar inferior a 50%. Foram bombardeadas um total de 16 placas, sendo oito delas com calos embriogênicos obtidos em meio M1.3, e quatro delas com explantes obtidos em meio M1.4. Foram reservadas quatro placas para controle da transformação. Os controles passaram por todos os processos do protocolo de transformação genética via biobalística, só não receberam tiros com o vetor pGPro1pUbi1. Em todas as placas foi efetuado um único tiro, com quatro membranas de ruptura, com pressão de gás Hélio de 1200 PSI, e a 6 cm de distância dos explantes.

Após o bombardeamento, calos embriogênicos foram mantidos por três dias no escuro a 25 ± 2 °C. No quarto dia, foram transferidos para o meio M1.3 com higromicina 20mg/L e mantidas no escuro a 25 ± 2 °C.

Com intervalos de duas semanas foram feitas duas repicagens para meios M1.3 com higromicina 20 mg/L, após as quais os calos foram transferidos para o meio MSCLreg (Tabela 1) também na presença de higromicina. As placas foram transferidas para luz a 25 ± 2 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Indução de calos em *Brachiariaruziziensis*

A indução de calos em sementes de *Brachiariaruziziensis* foi influenciada pelo meio de cultura utilizado. Após um mês de indução de embriogênese somática, os calos originados foram classificados em calos friáveis, calos com raiz e calos embriogênicos (Figura 4 A). No quadro 1 pode ser observada a resposta morfogênica de indução de calos friáveis, com raiz e embriogênicos em 48 % das sementes cultivadas no meio LP9; enquanto que, em relação à indução de calos embriogênicos, 14 % das sementes foram responsivas em meio M1.3 e 11 % responderam em meio M1.4. Nas condições testadas, o meio mais eficiente para indução de embriogênese somática em sementes maduras de *Brachiariaruziziensis* foi o meio M1.3, que apresentou melhor resultado do que o meio M1.4 usado por Ishigaki et al. (2012). A diferença na resposta morfogênica foi pequena, no entanto, como o meio M1.3 contém menor concentração da auxina 2,4-D (3 mg/L) do que o meio M1.4 (4 mg/L), é preferível usar o meio com menor quantidade dessa auxina para evitar a obtenção de plantas albinas, como descrito por CABRAL *et al.* (2012). Esses resultados com *B. ruzi* corroboram os obtidos por CABRAL (2012) com *B. brizantha*, onde o meio M1.3 resultou em maior indução de calos embriogênicos e regeneração de brotos em MSCLreg (MS3).

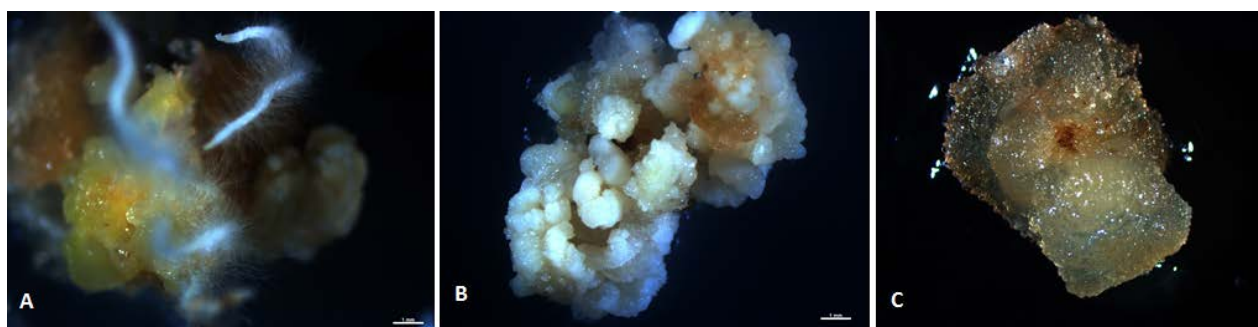


Foto: Letícia Calazans Queiroz

Figura 4- Aspectos da cultura de tecidos a partir de sementes de *Brachiariaruziziensis* e *Panicum maximum*: (A) *B. ruziziensis*, calo friável com raiz; (B) Cultivar Mombaça de *P. maximum*, calos embriogênicos; (C) cultivar Tanzânia de *P. maximum*, calo friável

Quadro 1- Resposta morfogênica de sementes maduras de *Brachiaria ruziziensis* aos diferentes meios de indução de embriogênese somática

Meio de cultura	Nº total de sementes	Média do Nº sementes com		
		Calos embriogênicos ± DM (%)	Calos friáveis ± DM (%)	Calos com raiz ± DM(%)
M1.3	1032	47±30,9 (14 %)	55,3±23,1 (16%)	29,3±16,2 (9%)
M1.4	1092	39±24,9 (11 %)	78,3±10,2 (22%)	14±10,2(4%)
LP9*	120	12 (10%)	39 (33%)	7 (6%)

Médias foram obtidas de três experimentos independentes. DM= Desvio médio. * Foi realizado somente um experimento.

4.2. Indução de calos em *Panicum maximum*, cultivares Mombaça e Tanzânia

A resposta morfogênica de formação de calos e calos embriogênicos na cultivar Mombaça foi mais expressiva do que na cultivar Tanzânia (Quadro 2). Na cultivar Mombaça houve maior indução de calos em 76% das sementes cultivadas no meio LP9, enquanto que no meio M1.3 houve maior indução de calos embriogênicos, que foi de 9%. Não foi observada a formação de calos com raiz. Apesar da elevada indução de calos friáveis (76 %) no meio LP9, esses calos não regeneraram embriões somáticos ou brotos quando foram transferidos para meio de regeneração (MSCLreg).

A cultivar Tanzânia apresentou uma baixa resposta morfogênica e apenas calos friáveis foram observados em 43% das sementes induzidas, não houve formação de calos embriogênicos ou com raiz (Quadro 2). Os calos friáveis da cultivar Tanzânia não regeneraram embriões somáticos ou brotos quando transferidos para meio de regeneração (MSCLreg).

Em estudo anterior, apenas a cv. Mombaça formou embriões somáticos bem diferenciados e brotos na combinação de meios M1.3/MSCLreg em 3% das sementes transferidas para o meio de regeneração (MSCLreg) (DUSI et al., 2013). As condições de cultura de tecidos testadas para formação de calos, embriões e plantas apresentaram baixa eficiência de regeneração, sendo necessário testar outras condições de cultura. No entanto,

a cultivar Álamo de *Panicum maximum* é a única desta espécie que tem metodologia publicada de regeneração e transformação genética via biobalística (RICHARDS *et al.*, 2001) e *Agrobacterium tumefaciens* (SOMLEVA, *et al.*, 2002). Nestes trabalhos também é relatada para a cultivar Álamo uma frequência de indução de calos no meio NB de 6%, que também é muito baixa. Esses calos, uma vez obtidos, podem ser multiplicados para serem usados nos experimentos de transformação genética, e esta capacidade de manutenção dos calos está sendo testada para as cultivares Mombaça e Tanzânia.

Quadro 2- Resposta morfogênica de sementes maduras das cultivares Mombaça e Tanzânia de *Panicum maximum* a diferentes meios de indução de embriogênese somática

Cultivar	Meio de cultura	Nº total de sementes	Média do N° sementes com		
			Calos embriogênicos ± DM (%)	Calos friáveis ± DM (%)	Calos com raiz (%)
Mombaça	LP9	444	1,5±1,5(1%)	167±52 (76%)	0
	M1.3*	192	18 (10%)	105(55%)	0
Tanzânia	LP9	392	0	27±15 (14%)	0
	M1.3*	252	0	107 (43%)	0

Médias foram obtidas de dois experimentos independentes. DM= Desvio médio. * Foi realizado somente um experimento.

4.3. Transformação de calos embriogênicos de *Brachiaria ruziziensis* via *Agrobacterium tumefaciens*

Calos embriogênicos induzidos no meio M1.3 morreram após a primeira repicagem na presença do antibiótico higromicina usado para selecionar as células. Já os calos embriogênicos induzidos em meio M1.4 apresentaram multiplicação na presença do agente seletivo após três repicagens, resultando em três placas com cinquenta calos embriogênicos cada, sendo uma delas o controle. Em seguida estes foram transferidos para o meio MSCLreg com higromicina.

Na cocultura², os calos induzidos no meio M1.3 e M1.4 sobreviveram ao serem transferidos para meio M1.3 com antibióticos. Após três repicagens no meio M1.3 com os antibióticos higromicina, claforan e timentin, os calos foram transferidos para o meio MSCLreg com os mesmos antibióticos.

*Regeneração dos calos transformados via *Agrobacterium tumefaciens**

Os calos embriogênicos de *Brachiaria ruziziensis* submetidos à transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* continuam em meio MSCLreg com higromicina e estão formando brotos verdes (Figura 6).

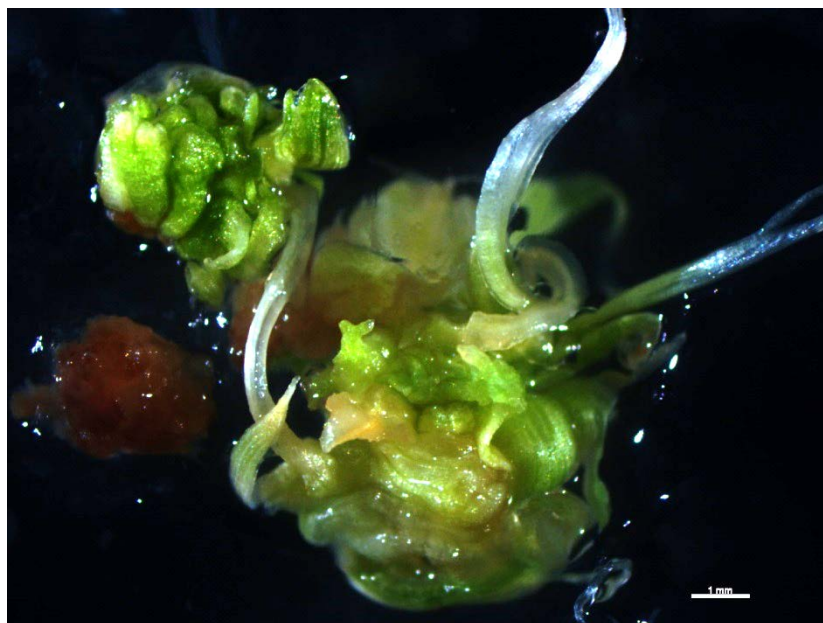


Foto: Letícia Calazans Queiroz

Figura 5- Regeneração de calo embriogênico de *Brachiaria ruziziensis* em meio MSCLreg com higromicina após a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

*4.4. Transformação de calos embriogênicos de *Brachiaria ruziziensis* via biobalística*

Depois de serem bombardeados, os calos embriogênicos passaram por três repicagens para o meio M1.3 adicionado de 20 µL/L de

higromicina, até serem transferidos para o meio MSCLreg, também com 20 μ L/L do agente seletor.

Regeneração de calos embriogênicos transformados via biobalística

Calos embriogênicos de *Brachiariaruziziensis* submetidos à transformação genética via biobalística continuam em meio MSCLreg com higromicina (Figura 5).

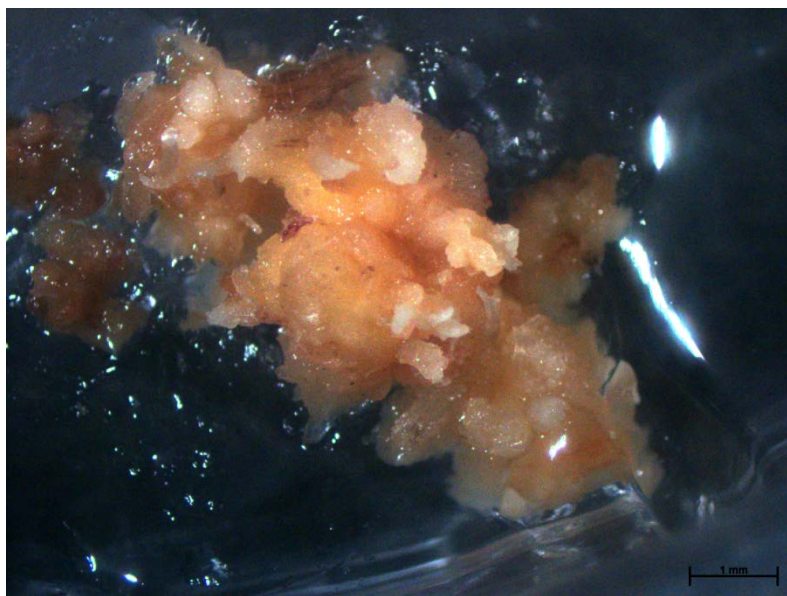


Foto: Letícia Calazans Queiroz

Figura 6- Embriões somáticos de *Brachiariaruziziensis* em desenvolvimento em meio MSCLreg com higromicina após a transformação genética via biobalística

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O meio M1.3 se mostrou mais eficiente para a indução de calos embriogênicos em sementes maduras de *Brachiariaruziziensis*.

- No meio LP9 houve maior resposta morfogênica de indução de calos friáveis em *Brachiaria ruziziensis*, no entanto esses calos não formaram embriões somáticos ou brotos.
- A cultivar Mombaça de *Panicum maximum* apresentou maior resposta embriogênica quanto à indução de calos embriogênicos e friáveis do que a cultivar Tanzânia.
- No meio M1.3 houve maior indução de calos embriogênicos da cultivar Mombaça de *Panicum maximum*.
- O desenvolvimento embriogenético de sementes maduras *Panicum maximum* abre perspectivas favoráveis ao seu melhoramento via transformação genética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, P. B.; PEDRO Jr., M. J.; DONZELLI, P. L. Zoneamento edafoclimático de plantas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS DE PASTAGENS, 2., 1993, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Fundação Universidade Estadual Paulista, 1993. p.1-16.

BAJAJ, Y. P. S. Somatic embryogenesis and synthetic seed, biotechnology in agriculture and forest. **Springer-Verlage**, New York, v. 30, p. 472, 1995.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **The Plant Journal**, Oxford, v.5, p.299-307, 1994.

BINNS, A. N. *Agrobacterium* - mediated gene delivery and the biology of host range limitations. **Physiology Plant**, Copenhagen, v. 79, p. 135 - 139, 1990.

BRASILEIRO, A. C. M. Transformação mediada por *Agrobacterium* sp. In: **Métodos de transferência e análise da expressão de genes em plantas**. CENARGEM, Brasília, cap. 3. p. 7 – 22, 1995.

CABRAL, G. B. **Cultura de tecidos e transformação genética de espécies da família *Poaceae***. 2012. 156 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, CENA, Piracicaba, 2012.

CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTTLER, L. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 90, p. 1121-1126, 1993.

CORSI, M.; SANTOS, P. M. Potencial de produção do *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 275-304, 1995.

CORSI, M. Manejo de plantas forrageiras do gênero *Panicum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9, Piracicaba, 1988. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 57-76.

CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, 1998.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular Biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro Embryogenesis in Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 20, p. 267-308, 1995.

DUSI, D. M. A.; CABRAL, G. B.; OLIVEIRA, R. B.; JANK, L.; CARNEIRO, V. T. C. Avaliação do potencial embriogenético de sementes maduras das cultivares Tanzânia e Mombaça de *Panicum maximum*. **I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos**, 18 e 19 de junho de 2013, Campo Grande, MS. Documentos 199 ISSN 1983-974X.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture- The technology. **Exegetics**, England, v. 1, n. 6, p. 575, 1993.

GERDES, L., WERNER, J. C., COLOZZA, M. T., CARVALHO, D. D., SCHAMMASS, E. A. Avaliação de Características Agronômicas e Morfológicas das Gramíneas Forrageiras Marandu, Setária e Tanzânia aos 35 Dias de Crescimento nas Estações do Ano. **Revistabrasileira de zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 4, 2000.

GRAY, D. J., FINER, J. J. Development and operation of five particle guns for introduction of DNA into plant cells. **PlantCell, TissueandOrganCulture**, Dordrecht, v. 33, p. 219, 1993.

GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNHP, Brasília, v. 2, p. 533-568, 1999.

HANDEL, C. L.; WAGNER, C. M.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Cereal genetic transformation via *Agrobacteriumtumefaciens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n.2, 1997.

ISHIGAKI, G., GONDO, T., SUENAGA, K., AKASHI, R. Fertiletransgenic*Brachiariaruziziensis* (ruzigrass) plantsbyparticlebombardmentoftetraploidizedcallus. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, n. 5, p. 546-549, 2012.

ISHIGAKI, G., GONDO, T., SUENAGA, K., AKASHI, R. Induction of tetraploidruzigrass (*Brachiariaruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings.**Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, 2009.

JANK, L.; MARIA, R.; RESENDE, S.; VALLE, C. B. Genética em pastagem. **REVISTA USP**, São Paulo, n.64, p. 86-93, 2005.

JANK, L. Melhoramento e seleção de variedades de *Panicum maximum*. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 12., Piracicaba, 1995. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p.21-58.

JANK, L.; SAVIDAN, Y.H.; SOUZA, M.T.C.; COSTA, J.C.G. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzida da África. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.23, p.433-440, 1994.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. Gus fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v.6, n.13, p.3901-3907, 1987.

KANG, H.; CHUN, Y. W. Plant regeneration through organogenesis in poplar. In: KLOPFENSTEIN, N. B.; CHUN, Y. M.; KIM, M.S.; AHUJA, R. M. (Ed.). **Micropropagation, genetic engineering and molecular biology of populus**. Colorado: Fort Collins, cap. 3, p. 13-23, 1997.

KELLER-GREIN, G., MAASS, B. L., HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W., MAASS, B. L., VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia:CIAT, Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p. 16-42.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v.327, p.70-73, 1987.

KOLTUNOW, A.M., BICKNELL, R.A., CHAUDHURY, A.M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 108, p.1345-1352, 1995.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The plant cell**, Baltimore, v. 5, p. 1425-1437, 1993.

LACORTE, C. β - Glucuronidase. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. EMBRAPA, SPI, Brasília, Cap.8, p.127-141, 1998.

MATEUS, R.P.G; FORNAROLLI, D.A; RIBEIRO, C.A; DEBASTIANI, R.; NOEDI, B. N.; GAZZIERO, D.L.P. Efeito da presença de *Brachiaria ruziziensis* em consórcio com milho (*Zeamays*) na supressão de plantas daninhas. In: **Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas**. Ribeirão Preto, trab. 314, p. 1484-1488, 2010.

MENDES-BONATO A. B.; RISSO-PASCOTTO C.; PAGLIARINI M. S.; VALLE C. B. Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Genetic Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 4, 2003.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, v. 20, p. 155-203, 1995.

MULLER, M. S., FANCELLI, A. L., DOURADO-NETO, D., GARCIA Y GARCIA, A., OVEJERO, R. F. L. Produtividade do *Panicum maximum* cv. Mombaça irrigado, sob pastejo rotacionado. **Scientia agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, 2002.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOVOA, C.O.; COLES, G. Computer image analysis to quantify and analysis stable transformation identified using the histochemical GUS assay. **Plant Molecular Biology Reports**, New York, v.12, p. 146-151, 1994.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**, Rondonópolis, v. 1183, p. 549-601, 2001.

REAM, W. *Agrobacterium tumefaciens and interkingdom genetic exchange*. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.583-586, 1989.

RENVOIZE, S. A., CLAYTON, W. D., KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W., MAASS, B. L., VALLE, C. B., (Ed.). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**. Cali-Colombia: CIAT, Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p. 1-15.

ROCHA, G.L. Ecossistemas de pastagens: aspectos dinâmicos. Piracicaba: FEALQ, 1991. 391 p. **Apud**: POMPEU, R. C. F. Morfofisiologia do dossel e desempenho bioeconômico de ovinos em capim Tanzânia sob lotação rotativa com quatro níveis de suplementação concentrada. 2006. 145 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Fortaleza, 2006.

RUSSELL, J.A.; ROY, M.K.; SANFORD, J.C. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, n.3, p.1050-1056, 1992.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA: Part H**. Academic Press, San Diego, v. 217, p. 483-510, 1993.

SKERMAN, P. J., RIVEROS, F. **Gramíneas tropicales**. Roma: Organización de Las Naciones Unidas para La Agricultura Y La Alimentación, p.849, 1992.

SOMLEVA, M. N.; TOMASZEWSKI, Z.; CONGER, B. V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of switchgrass. **Crop Science**, Madison, v.42, p. 2080- 2087, 2002.

STEWART, Jr., NEAL, C. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 8, p. 390-396, 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. SPI/EMBRAP-CNHP, Brasília, v. 1, p. 261-269, 1998.

VALLE, C. B., BONATO, A. L. V., PAGLIARINI, M. S., RESENDE, R. M. S., JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C., DUSI, D. M. A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p. 126, 2004.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; BONATO, A. L. V. Lançamento de Cultivares Forrageiras: o Processo e seus Resultados – cvs. Massai, Pojuca, Campo Grande, Xaraés In: EVANGELISTA, A. R.; SIDNEI, T. R.; GOMIDE, E. M. (Ed.). **Forragicultura e Pastagens: Temas em Evidência – Sustentabilidade**. Editora UFLA, Lavras, v.1, p. 179-225, 2003.

VALLE, C. B., SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W., MAASS, B. L., VALLE, C. B., (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT, Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p. 147-163.

VICIENT, C. M., MARTINEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, n. 10, v.1, p.1-12, 1998.

WILMINK, A.; DONS, J.J.M. Selective agents and marker genes for use in transformation in monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Reports**, New York, v.11, p.165-185,1993.

ZHAO, Q.; WANG, J. J. G.; FENG, Y. Y.; XING, H. W.; GUAN, C. F. Optimization in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Anthuriumandraeanum* using GFP as a reporter. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 5, 2013.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **PlantCell**, Dordrecht, v. 5, p. 1411-1423, 1993.